

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT: Ghee Hong Jin, et al.) Group Art No.: NYA
)
FOR: ALKALINE LIPASE FROM VIBRIO) Examiner: NYA
METSCHNIKOVII RH530 N-4-8 AND)
NUCLEOTIDE SEQUENCE ENCODING)
THE SAME)

CLAIM FOR PRIORITY

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450


Dear Commissioner:

Enclosed herewith is a certified copy of Korean Patent Application No. 2002-0035410 filed on June 24, 2002. The enclosed Application is directed to the invention disclosed and claimed in the above-identified application.

Applicant hereby claims the benefit of the filing date of June 24, 2002, of the Korean Patent Application No. 2002-0035410, under provisions of 35 U.S.C. 119 and the International Convention for the protection of Industrial Property.

Respectfully submitted,

CANTOR COLBURN LLP

By:  _____
Soonja Bae
Registration No. (Please see attached)
Cantor Colburn LLP
55 Griffin Road South
Bloomfield, CT 06002
Telephone: (860) 286-2929
Fax: (860) 286-0115
PTO Customer No. 23413

Date: June 24, 2003

**KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE**

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

Application Number: Korean Patent 2002-0035410

Date of Application: 24 June 2002

Applicant(s): CJ Corp.

14 June 2003

COMMISSIONER

[Bibliography]

[Document Name]	Change to informative data of applicant
[Receiver]	Commissioner
[Filing Date]	25 October 2002

[Applicant]	
[Name]	CJ Corporation
[Applicant code]	1-1998-003466-9

[Items to be changed]	
[Changed Item]	Korean Name
[Before change]	Cheil Jedang Corporation
[After change]	CJ Corporation

[Items to be changed]	
[Changed Item]	English Name
[Before change]	Cheil Jedang Corporation
[After change]	CJ Corporation

[Items to be changed]	
[Changed Item]	Registered Seal
[Before change]	
[After change]	

[Purpose]	We notice as above according to Art. 9 of the Patent Law, Art. 12 of the Utility Model Law, Art. 28 of the Design Law and Art. 23 of the Trademark Law.
-----------	---

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

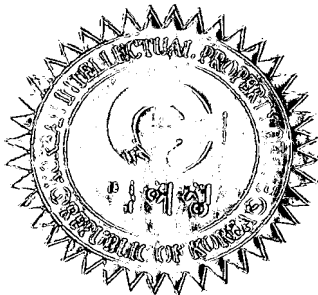
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0035410
Application Number

출원년월일 : 2002년 06월 24일
Date of Application JUN 24, 2002

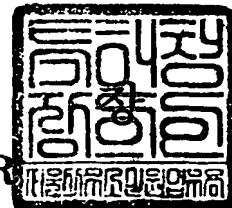
출원인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.



2003 년 06 월 14 일

특 허 청

COMMISSIONER



출력 일자: 2003/6/14

【서지사항】

【서류명】

출원인정보변경 (경정)신고서

【수신처】

특허청장

【제출일자】

20021025

【출원인】

【명칭】

씨제이 주식회사

【출원인코드】

119980034669

【변경(경정)사항】

【변경(경정)항목】

한글 성명(명칭)

【변경(경정)전】

제일제당주식회사

【변경(경정)후】

씨제이 주식회사

【변경(경정)사항】

【변경(경정)항목】

영문 성명(명칭)

【변경(경정)전】

CHEIL JEDANG CORPORATION

【변경(경정)후】

CJ Corp.

【변경(경정)사항】

【변경(경정)항목】

인감

【변경(경정)전】

【변경(경정)후】

【취지】

특허법시행규칙 제9조·실용신안법시행규칙 제12조·
의장법시행규칙 제28조 및 상표법시행규칙 제23조의
규정에 의하여 위와 같이 신고합니다.

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0007
【제출일자】	2002.06.24
【국제특허분류】	C12N
【발명의 명칭】	비브리오 메치니코비 RH530 N-4-8 유래의 알칼리성 지방질 분해효소 및 이를 코드하는 뉴클레오티드 서열
【발명의 영문명칭】	An alkaline lipase from <i>Vibrio metschnikovii</i> RH530 N-4-8 and a nucleotide sequence encoding the same
【출원인】	
【명칭】	제일제당 주식회사
【출원인코드】	1-1998-003466-9
【대리인】	
【성명】	이영필
【대리인코드】	9-1998-000334-6
【포괄위임등록번호】	2000-021089-8
【대리인】	
【성명】	이태호
【대리인코드】	9-1998-000335-2
【포괄위임등록번호】	2002-008457-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	진기홍
【성명의 영문표기】	JIN, Ghee Hong
【주민등록번호】	610227-1121016
【우편번호】	158-050
【주소】	서울특별시 양천구 목동아파트 532-506
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	전성후
【성명의 영문표기】	JHON, Sung Hoo
【주민등록번호】	740911-1025710

【우편번호】	135-270
【주소】	서울특별시 강남구 도곡동 516-1 현대맨션 1동 102호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이현환
【성명의 영문표기】	LEE,Hyun Hwan
【주민등록번호】	580910-1829510
【우편번호】	449-854
【주소】	경기도 용인시 모현면 왕산리
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	노현모
【성명의 영문표기】	RHO,Hyune Mo
【주민등록번호】	370407-1467227
【우편번호】	151-010
【주소】	서울특별시 관악구 신림동
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터 (KCCM)
【수탁번호】	KCCM-10384
【수탁일자】	2002.06.04
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터 (KCCM)
【수탁번호】	KCCM-10385
【수탁일자】	2002.06.04
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	5
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이영필 (인) 대리인 이태호 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
---------	----	---	--------	---

【가산출원료】	14	면	14,000	원
---------	----	---	--------	---

【우선권주장료】	0	건	0	원
----------	---	---	---	---

【심사청구료】	12	항	493,000	원
---------	----	---	---------	---

【합계】	536,000	원		
------	---------	---	--	--

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통
2. 미생물기탁증명서[원, 역문]_2통

【요약서】

【요약】

본 발명은 비브리오 메치니코비(*Vibrio metschnikovii*) RH530으로부터 유래한 알칼리성 지방질 분해효소 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 관한 것으로, 구체적으로는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 알칼리성 지방질 분해효소 및 서열번호 4의 염기서열을 갖는 상기 알칼리성 지방질 분해효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명의 알칼리성 지방질 분해효소에 의하면, 높은 pH(10~11)에서 최적 활성을 보이고, 효소 잔존율도 매우 높으며, 계면활성제와의 적합성도 높아 세탁 세제용 효소로서 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 9a

【색인어】

알칼리성 지방질 분해효소, 비브리오 메치니코비

【명세서】

【발명의 명칭】

비브리오 메치니코비 R H530 N-4-8 유래의 알칼리성 지방질 분해효소 및 이를 코딩하는 뉴클레오티드 서열{An alkaline lipase from *Vibrio metschnikovii* RH530 N-4-8 and a nucleotide sequence encoding the same}

【도면의 간단한 설명】

도1은 본 발명의 알칼리성 지방질 분해효소의 유전자를 포함하는 3.2kb DNA 삽입체(*vaIL*)가 포함된 재조합 벡터 pHL1을 나타내는 도면이다.

도2는 본 발명의 알칼리성 지방질 분해 효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pHL1의 아가로스 젤 전기영동 사진으로서, M은 사이즈 마커이고, 1 레인은 수퍼코일 형태의 pUC19이고, 2 레인은 *Hind*III로 소화된 pUC19이고, 3레인은 *Hind*III로 소화된 재조합 벡터 pHL1로서, 2.7Kb 위치의 밴드는 벡터 pUC19이고, 3.2Kb 위치의 밴드는 본 발명의 알칼리성 지방질 분해 효소 유전자를 포함하는 DNA 삽입체이며, 4 레인은 수퍼코일 형태의 재조합 벡터 pHL1이다.

도3a는 본 발명의 알칼리성 지방질 분해 효소 유전자를 포함하는 DNA 단편의 아가로스 젤 전기영동 사진이고, 도3b는 서던 블롯팅 사진으로서, M은 DIG로 표지된 사이즈 마커이고, 1 레인은 비브리오 메치니코비 염색체 DNA이고, 2 레인은 *Hind*III로 소화된 비브리오 메치니코비 염색체 DNA이고, 3 레인은 *Ava*I 및 *Eco*RI로 소화된 비브리오 메치니코비 염색체 DNA이고, 4레인은 *Hind*III로 소화된 pUC19이고, 5 레인은 수퍼코일 형태

의 재조합 벡터 pHL1이고, 6 레인은 *Hind*III로 소화된 재조합 벡터 pHL1이고, 7 레인은 재조합 벡터 pHL1/*Ava*I, *Eco*RI (프로브)이다.

도4a 및 b는 본 발명의 비브리오 유래의 알칼리성 지방질 분해 효소 유전자가 포함된 DNA 삽입체의 염기서열, 조절인자 및 이로부터 추론되는 아미노산 배열을 나타내는 도면이다.

도5는 재조합 벡터 pHL1의 DNA 삽입체 중 본 발명의 알칼리성 지방질 분해효소의 발현에 필수적인 최소 길이와 유전자의 위치를 확인한 제한효소 지도이다.

도6은 본 발명의 알칼리성 지방질 분해 효소의 유전자로부터 유추된 아미노산 서열과 슈도모나스 글루메(*Pseudomonas glumae*), 부크홀더리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*)와의 아미노산 서열을 비교한 결과를 나타내는 도면이다.

도7a는 본 발명의 알칼리성 지방질 분해 효소 유전자의 프로모터 앞부분의 제한효소지도이고, 도7b는 제한효소를 이용하여 프로모터 앞부분을 제거했을 때의 활성 변화를 나타내는 도면이다.

도8a는 온도에 따른 본 발명의 알칼리성 지방질 분해 효소의 활성도 변화를 나타내는 도면이고, 도8b는 온도에 따른 잔존 활성 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도9a는 pH 변화에 따른 본 발명의 알칼리성 지방질 분해 효소의 활성도 변화를 나타내는 도면이고, 도9b는 pH 변화에 따른 잔존 활성 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도10은 계면활성제나 세제가 본 발명의 알칼리성 지방질 분해 효소의 활성도

와 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 소듐-올레핀술포네이트 (AOS;sodium-olefinsulfonate)(도10a), 소듐알킬벤젠-술포네이트(LAS;sodium alkylbenzen-sulfonate)(도10b) 또는 소듐 도데실설페이트(SDS;sodium dodecyl sulfate)(도10c)를 효소액에 섞어준 후, 0.5%의 트리카프릴린 배지에 스팟팅한 결과를 나타내는 도면이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<11> 본 발명은 비브리오 메치니코비(*Vibrio metschnikovii*) RH530 N-4-8 균주로부터 유래한 알칼리성 지방질 분해효소 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터에 의하여 형질전환된 형질전환 숙주세포 및 상기 형질전환 숙주세포를 이용한 알칼리성 지방질 분해효소의 생산방법에 관한 것이다.

<12> 알칼리성 지방질 분해효소는 알칼리성 pH 하에서 트리아실글리세롤을 글리세롤과 지방산으로 분해하는 효소를 말한다. 알칼리성 지방질 분해효소를 생산하는 미생물은 지금까지 다양하게 보고되고 있다. 이중에, 슈도모나스속(*Pseudomonas*), 바실러스속(*Bacillus*) 등이 대표적으로 알려져 있다. 이러한 효소들은 세제와 같은 알칼리성 조건에서 지방질 분해를 필요로 하는 산업분야에 응용되어 왔다.

- <13> 한편, 현재 시판중인 세제용 지방질 분해 효소의 생화학적 특성은 약알칼리성 pH(8~9)에서 최적의 활성을 나타내고, LAS와 같은 음이온 계면활성제 하에서 비교적 빠르게 불활성화된다.
- <14> 따라서, 보다 높은 pH(10~11)에서 최적 활성을 보이고, 효소 잔존율도 매우 높으며, 계면활성제와 적합성도 높은 지방질 분해효소의 필요성이 존재하고 있었다.
- <15> 본 발명자들은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 연구하던 중, 대한민국 특허 제145277호 및 제258740호에 개시되어 있는 세제용 단백질 분해효소를 생산하는 균주인 비브리오 메치니코비 RH530 N-4-8 균주(*V. metschnikovii* RH530 N-4-8: 한국종균협회에 1998년 2월 23일자로 기탁하였음. 기탁번호 KFCC-11030)가 지방질 분해 효소도 생산한다는 사실을 발견하고, 이의 생화학적 특성 및 이를 코딩하는 유전자, 계면 활성제에 대한 저항성 등을 연구하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <16> 본 발명은 목적은 높은 pH(10~11)에서 최적 활성을 보이고, 효소 잔존율도 매우 높으며, 계면활성제와의 적합성도 높은 지방질 분해효소를 제공하는 것이다.
- <17> 또한, 본 발명을 목적은 상기 지방질 분해효소를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.
- <18> 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 지방질 분해효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.
- <19> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터에 의하여 형질전환된 형질전환 숙주세포를 제공하는 것이다.

<20> 또한, 본 발명의 목적은 상기 형질전환 숙주세포를 배양하여 상기 지방질 분해효소를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<21> 본 발명의 비브리오 메치니코비 RH530 N-4-8 균주(*Vibrio metschnikovii* RH530 N-4-8)로부터 유래한 알칼리성 지방질 분해효소는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

<22> 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5의 아미노산 서열을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열, 서열번호 2 및 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

<23> 또한, 본 발명의 재조합 벡터는, 서열번호 5의 아미노산 서열을 코드하는 폴리뉴클레오티드, 바람직하기로는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하기로는 pHL1, pHLB29 또는 pHAH38이다.

<24> 본 발명의 형질전환된 형질전환 숙주세포는, 서열번호 5의 아미노산 서열을 코드하는 폴리뉴클레오티드, 바람직하기로는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의하여 형질전환된 것임을 특징으로 한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하기로는 pHL1, pHLB29 또는 pHAH38이다. 상기 형질전환된 형질전환

숙주세포는, 바람직하기로는 상기 재조합 벡터에 의하여 형질전환된 대장균이다. 상기 형질전환된 대장균은 바람직하기로는, HB101(pHL1)이다.

<25> 또한, 본 발명의 비브리오 메치니코비 RH530 N-4-8 균주(*Vibrio metschnikovii* RH530 N-4-8)로부터 유래한 알칼리성 지방질 분해효소를 제조하는 방법은, 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

<26> 또한, 본 발명의 세제는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 비브리오 메치니코비(*Vibrio metschnikovii*) RH530 N-4-8 균주로부터 유래한 알칼리성 지방질 분해효소를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 세제는 바람직하기로는, 액상 또는 분말상을 띄는 것이다.

<27> 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<28> 실시예

<29> 본 실시예에는 대한민국 특허 제10-0145277호 및 제10-0258740호에서 이미 공지된 세제용 단백질 분해효소를 생산하는 균주인 비브리오 메치니코비 RH530 N-4-8 균주(*V. metschnikovii* RH530 N-4-8)가 지방질 분해효소도 생산한다는 사실을 발견하고, 이의 생화학적 특성 및 이를 코딩하는 유전자, 계면 활성제에 대한 저항성 등을 연구하였다.

<30> 먼저, 알칼리성 지방질 분해효소를 코딩하는 유전자를 분리하기 위해 비브리

오 메치니코비 RH530 N-4-8 균주를 배양 후 세포를 수확하여 리소자임을 처리하여 세포를 용해시켰다. 여기에 페놀과 클로르포름을 처리하여 단백질을 제거하고, 고형물을 원심분리로 제거한 상등액에서 비브리오의 염색체 DNA를 얻었다. 얻어진 염색체 DNA를 제한효소로 잘라서 유전자 운반체인 벡터(pUC19)에 재조합하여 pHL1, pHLB29 등의 재조합 벡터를 제작하였고, 이를 대장균에 형질전환하였다. 클로닝된 균주의 스크리닝은, 표1에 명시된 배지에 지방질 분해효소의 기질인 트리부티린(tributyrin) 혹은 트리카프릴린(tricaprylin)을 0.5%~1%되게 첨가하고 유화제로 폴리옥시에틸렌(7eo)을 0.1%, 아가를 1.8%되게 첨가하여 제조된 배지에서 자란 콜로니 주위에 투명환을 형성하는 균주를 선별하였다. 이렇게 선별된 대장균을 HB101(pHL1)이라 하였다.

<31> 제조된 재조합 대장균 HB101(pHL1)에서 추출한 조효소액으로, 알칼리성 pH 조건에서 지방질 분해효소의 활성을 측정하여, 알칼리성 지방질 분해효소의 발현을 확인하였다.

<32> 상기 재조합 벡터를 제한효소로 잘라 재조합 벡터 중에 삽입된 외래 DNA 단편의 염기서열을 밝혔다.

<33> 실시예1: 알칼리성 지방질 분해효소 유전자의 클로닝

<34> 비브리오 메치니코비 RH530 N-4-8 균주를 하기 표1의 조성으로 된 배지를 이용하여 30℃ 에서 배양한 후에 세포를 회수하고 리소자임을 처리하여 세포를 용해시켰다. 여기에 페놀과 클로르포름을 처리하여 단백질을 제거하고, 고형물을 원심분리로 제거한 상등액에서 비브리오의 염색체 DNA를 얻었다. 이 염색체 DNA를 제한효소인 *Hind*III로 잘라서 운반체인 벡터(pUC19)에 재조합하고, 대장균 HB101에 형질 전환하여 3.2Kb의 알칼리성

지방질 분해효소 유전자를 포함하는 DNA 단편을 클로닝하였다. 이 클론을 벡터 pHL1(도 1)이라 명명하였다. 클로닝한 제한효소인 *HindIII*로 처리한 후 1% 아가로스 젤 전기영동을 하였다. 아가로스 젤 전기영동을 통하여 분석한 결과 알칼리성 지방질 분해효소 유전자가 클로닝되었음을 확인하였다(도2).

<35> **【표 1】**

LSC 배지	
조성	함량(g/L)
트립톤(Trypton)	10
이스트 엑스트랙트(Yeast extract)	5
염화나트륨(Sodium chloride)	10
1M 탄산나트륨 완충용액 (Sodium carbonate buffer, pH 10.5)	100(ml/L)

<36> **실시예2 : pHL1의 서던 블롯팅**

<37> 도1의 구조를 갖는 재조합 벡터 pHL1에 포함되어 있는 비브리오 메치니코비 유래의 알칼리성 지방질 분해효소 유전자를 포함하는 DNA 단편이 원균주로부터 유래되었음을 확인하기 위해 서던 블롯팅을 수행하였다.

<38> 프로브는 pHL1을 제한효소인 *AvaI* 과 *EcoRI* 을 이용하여 자른 0.8kb의 DIG(DIG DNA Labelling Kit, Roche Diagnostics)가 표지된 DNA 조각을 사용하고, 원 균주인 *Vibrio metschnikovii* RH530 N-4-8에서 추출한 염색체 DNA와 블롯팅한 결과, 3.2kb에서 유색의 밴드가 확인되었다(도 3a 및 3b).

<39> 이로써 재조합 벡터인 pHL1에 포함되어 있는 유전자가 원균주인 비브리오 메치니코비 RH530 N-4-8 균주에서 유래된 것임을 확인할 수 있었다(도 3a, 3b 및 도4).

<40> **실시예3 : 지방질 분해효소 유전자의 위치 확인을 위한 서브클로닝**

- <41> 재조합된 벡터에 삽입되어 있는 외래 DNA 중의 유전자의 위치를 확인하기 위하여, 3.2kb의 DNA를 엑소 뉴크레아제인 *Bal*31로 처리하여 지방질 분해효소의 발현에 필수적인 최소 길이로 서브클로닝하였다.
- <42> 지방 분해효소의 생산은 투명환(halo) 형성을 통해 평가하였으며, 서브클로닝 결과 지방질 분해효소의 활성화에 2.6kb DNA 단편이 필수적임을 알아내었다. 이러한 최소 길이의 유전자를 포함하는 재조합 벡터는 pHLB29라 명명하였다.
- <43> 또한, 2.6kb의 DNA 단편은 pUC19의 *Sma* I 사이트에 역방향으로 서브클로닝하고, pHAAH38라 명명하였다.
- <44> pHAAH38은 2.6kb의 DNA 단편이 *lac* 프로모터까지 역 방향으로 불구하고, 트리카 프릴린 배지에서 할로를 형성함으로써, 상기 2.6kb DNA 단편에 알칼리성 지방질 분해효소의 프로모터가 존재하고, 대장균에서 전사될 때에 자신의 프로모터를 사용한다는 것을 알아내었다(도5).
- <45> 실시예4: 염기서열 분석을 위한 재조합 벡터의 제작
- <46> 위에서 제작된 재조합 벡터 pHL1의 DNA 삽입체를 여러 가지 제한 효소를 이용해 작은 크기로 자른 후, 다시 pUC19 벡터에 재도입하여 대장균을 형질전환시켰다. 이 재조합 벡터 중의 삽입체의 DNA 염기서열 분석을 수행한 결과를 서열번호 1에 나타내었다. 한 개의 프로모터 하에 797bp(서열번호 2), 554bp(서열번호 4)로 이루어진 두 개의 유전자(ORF1, ORF2)가 존재한다는 것을 알아내었다. 이들로부터 발현되는 효소를 각각 Val L1 및 Val L2라 명명하고, 이를 코딩하는 유전자를 각각 *va/L1* 및 *va/L2*라 명명하였다. *va/L1* 및 *va/L2* 유전자의 염기서열은 각각 서열번호 2와 4에 나타내었으며, 이들이 코드하

는 폴리펩티드의 아미노산 서열은 각각 서열번호 3과 5에 나타내었다. 또한, 원핵 세포에 공통적인 -35, -10부위와 일치되는 염기 서열을 발견할 수 있었으며, 샤인 달가노 서열(SD sequence)도 가지고 있음이 확인되었다(도4). 이 부위의 서열과 다른 여러 가지 지방질 분해효소의 서열에 대한 상동성을 비교한 결과, 두 번째 유전자에서 슈도모나스 글루매(*Pseudomonas glumae*)와 부크홀더리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*)의 지방질 분해효소의 유전자와 각각 17.5%, 18.3%의 상동성을 보였다. 그리고, 이 유전자에서 지방질 분해효소의 활성부위를 이루는 G-X1-S-X2-G와 일치되는 부분을 갖고 있는 것을 볼 수 있었다(도6). 따라서, 이 유전자는 지방질 분해 효소의 유전자이며, 앞쪽의 유전자는 지방 분해효소의 샤페론(chaperon)이거나 세포외 분비에 보조역할을 하는 유전자라고 사료된다.

<47> 실시예5: 알칼리성 지방질 분해효소의 활성과 안정도 측정

<48> 효소 활성의 측정방법은 천연 오일(oil)을 유화시켜 수행하는 방법과는 달리, 합성 기질인 p-니트로페닐 팔미테이트(p-nitrophenyl palmitate :pNPP)를 기질로 하여 측정하였다. 먼저, 모주인 비브리오 메치니코비 RH530(*V. metschnikovii* RH530) 또는 지방질 분해효소 유전자가 클로닝된 재조합 균주를 배양하여 얻어진 조효소액 20 μ l를 50mM 트리스-염산(pH6.8)과 0.5% 아라빅검이 포함된 완충용액 880 μ l에 첨가하였다. 그 후, 100mM p-나이트로페닐 팔미테이트 용액 100 μ l을 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응시켰다. 10분 후에 3M 염산 0.5ml을 첨가하여 반응을 정지시킨 다음, 원심 분리하여 1ml의 상등액에 2M NaOH 3ml를 첨가하여, 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

<49> 다른 방법으로는 기질로 p-나이트로페닐 부티레이트(p-nitrophenyl butyrate; p-NPB)을 사용하였다. 먼저, p-나이트로페닐 부티레이트를 디메실술폭사이드에 10mM 되

게 용해시켜 기질 용액을 제조하였다. 이 기질용액 30 μ l를 50mM 트리스-염산과 0.1% 트리톤-X-100(pH8.2)이 포함된 완충용액과 섞고, 30 μ l의 지방질 분해 조효소액을 첨가하여 최종 3ml를 만들었다. 역시 37℃에서 10분 동안 반응시킨 후에, 아세톤 3ml을 첨가하여 반응을 정지시킨 다음, 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

<50> 단백질의 정량분석은 보바인 시럼 알부민(BSA)을 기준으로 하여 로우리(Lowry)의 방법을 따랐다.

<51> 실시예6: 프로모터 앞부분이 효소의 발현에 미치는 영향 연구

<52> 프로모터 앞부분이 비브리오 메치니코비 알칼리성 지방질 분해효소의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 제한효소를 사용하여 프로모터 앞부분을 제거하였다. 효소의 활성측정은 p-나이트로페닐 부티레이트(p-nitrophenyl butyrate; p-NPB)를 기질로 이용하였으며, 제한효소는 *Bam*HI, *Af*III를 사용하였다. 그 결과, 프로모터 앞부분이 500bp가 제거되면, 효소의 역가가 정상적인 것보다 40%정도 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

<53> 이로서, 프로모터 앞부분은 효소의 발현에 중요한 영향을 미치는 것을 유추할 수 있었다(도 7a 및 7b).

<54> 실시예7: 재조합 균주에서 추출한 지방질 분해효소의 생화학적 특성

<55> 온도, pH, 계면활성제나 세제가 지방질 분해 효소의 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 지방질 분해효소의 유전자를 함유한 재조합 균주로부터 조효소액을 제조하여 아래와 같은 실험을 수행하였다.

<56> (1) 온도가 효소의 활성도와 안정성에 미치는 영향

<57> 온도의 영향을 알아보기 위해서, 지방질 분해 효소 유전자를 포함하고 있는 대장균 HB101(pHL1)를 표1에 예시한 배지에서 18시간 배양하여 균체를 회수하였다. 그 후, 생리 식염수로 2회 세척하고, 소니케이터 혹은 프렌치 프레스 등으로 균체를 파쇄하고, 15,000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리에서 얻어진 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액을 p-NPB와 혼합하여, 10℃에서 80℃까지의 다양한 온도 범위에서 2시간 반응시킨 후, 지방질 분해 효소의 활성도와 안정성을 앞에서 서술한 역가 측정 방법으로 수행하였다. 그 결과, 50~60℃에서 가장 높은 활성도를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 잔존활성을 측정한 결과 40℃까지는 안정하지만, 60℃부터는 급격히 안정도가 떨어짐을 확인할 수 있었다(도8a 및 b)

<58> (2) pH가 효소의 활성도와 안정성에 미치는 영향.

<59> pH가 효소의 활성도와 안정성에 미치는 영향을 조사하기 위해, 상기와 같은 방법으로 추출한 조효소액으로 반응 조건을 동일하게 하여 최적 pH 및 여러 버퍼(50mM sodium phosphate(pH 6~7): ◆, 50mM Tris-HCl(pH 7~9): ■, 50mM 소듐 카보네이트(sodium carbonate)(pH 9~11): ▲, 50mM 소듐-포스페이트(sodium phosphate)-NaOH(pH 11~12): *) 하에서의 효소 잔존율을 조사하였다. 그 결과, 최적 pH는 10~11이었다. pH에 대한 효소 잔존율은 20℃에서 12시간 방치 후, 잔존 활성을 조사하였으며, 그 결과 pH 8~10 사이에서 매우 안정함을 확인할 수 있었다(도 9b).

<60> (3) 계면활성제가 효소의 활성도와 안정성에 미치는 영향.

- <61> 세제의 주성분인 계면활성제에 대한 저항성을 측정하기 위해, 소듐-알파올레핀술포네이트(AOS; sodium-alphaolefinsulfonate), 소듐알킬벤젠-술포네이트 (LAS; sodium alkylbenzen-sulfonate), 소듐 도데실 설페이트(SDS; sodium dodecyl sulfate)를 효소액에 섞어준 후, 0.5%의 트리카프릴린 배지에 스팟팅하였다.
- <62> 그 결과, 비브리오 알칼리성 지방질 분해효소는 0.07%의 소듐알킬벤젠-술포네이트(LAS), 0.1%의 소듐-올레핀술포네이트(AOS)에 내성을 갖음을 확인할 수 있었다.
- <63> 또한, 0.1%의 소듐 도데실 설페이트(SDS)에서도 효소가 활성을 보임으로써 이 효소가 세탁 세제의 첨가제로 적합함을 알 수 있었다(도11).
- <64> 현재 시판중인 세제용 지방질 분해 효소의 생화학적 특성이 약알칼리성 pH(8~9)에서 최적의 활성을 나타내고, LAS와 같은 음이온 계면활성제 하에서 비교적 빠르게 불활성화된다. 이에 비해, 본 명세서에 개시된 지방질 분해 효소는 높은 pH(10~11)에서 최적 활성을 보이고, 효소 잔존율도 매우 높으며, 계면활성제와 적합성도 높으므로, 기존의 지방질 분해효소보다 성능면에서 우수하다고 판단되며, 세탁세제용 효소로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.
- <65> 본 실시예에서 제조된 재조합 벡터의 기탁
- <66> 본 실시예에서 제조된 재조합 벡터 pHL1, pHLB29은 국제 기탁기관인 한국종균협회에 2002년 6월 11일자로 기탁번호 KCCM-10384, KCCM-10385로 기탁하였다.

【발명의 효과】

<67> 본 발명의 알칼리성 지방질 분해효소에 의하면, 높은 pH(10~11)에서 최적 활성을 보이고, 효소 잔존율도 매우 높으며, 계면활성제와의 적합성도 높아 세탁 세제용 효소로서 유용하게 사용될 수 있다.

<68> 본 발명의 알칼리성 지방질 분해효소를 코드하는 유전자는, 기존의 다른 알칼리성 지방질 분해효소의 유전자와 상동성이 매우 낮으며, 높은 pH(10~11)에서 최적 활성을 보이고, 효소 잔존율도 매우 높으며, 계면활성제와의 적합성도 높아 세탁 세제용 효소로서 유용한 알칼리성 지방질 분해효소를 코드한다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 알칼리성 지방질 분해효소.

【청구항 2】

서열번호 5의 아미노산 서열을 코드하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 4】

제2항에 있어서, 서열번호 2 및 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 5】

제2항에 있어서, 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 6】

제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 7】

제6항에 있어서, pHL1, pHLB29 또는 pHAH38임을 특징으로 하는 재조합 벡터.

【청구항 8】

제6항 또는 제7항의 벡터에 의하여 형질전환된 형질전환 숙주세포.

【청구항 9】

제8항에 있어서, 숙주세포가 대장균인 것을 특징으로 하는 형질전환 숙주세포.

【청구항 10】

제9항에 있어서, HB101(pHL1)임을 특징으로 하는 형질전환 숙주세포.

【청구항 11】

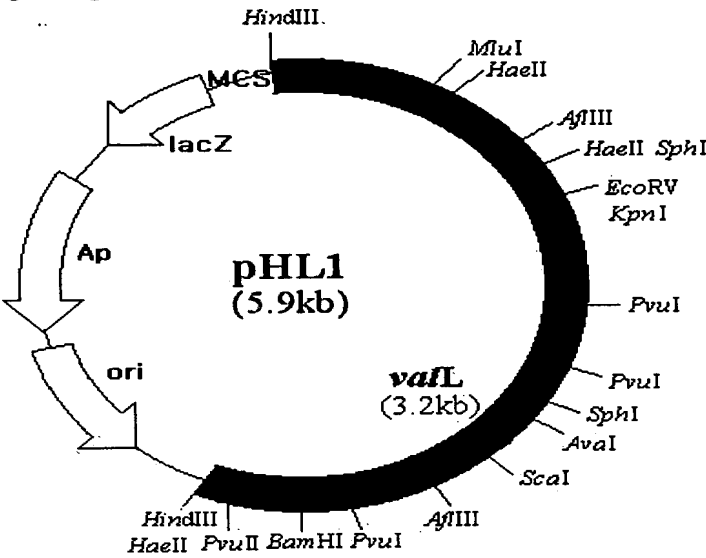
제8항의 형질전환 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 알칼리성 지방질 분해효소를 제조하는 방법.

【청구항 12】

제1항의 알칼리성 지방질 분해효소를 포함하는 세제.

【도면】

【도 1】



【도 2】



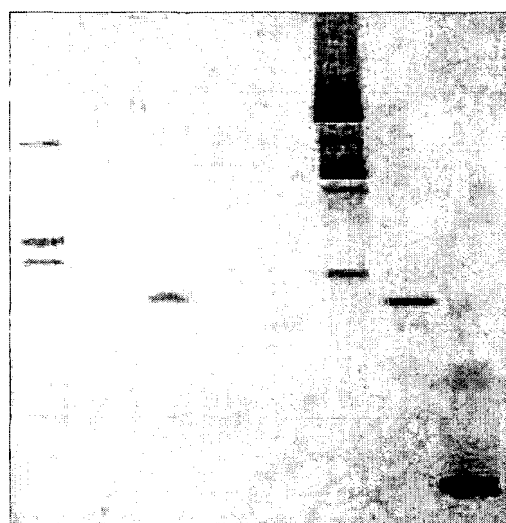
【도 3a】

M 1 2 3 4 5 6 7



【도 3b】

M 1 2 3 4 5 6 7



【도 4a】

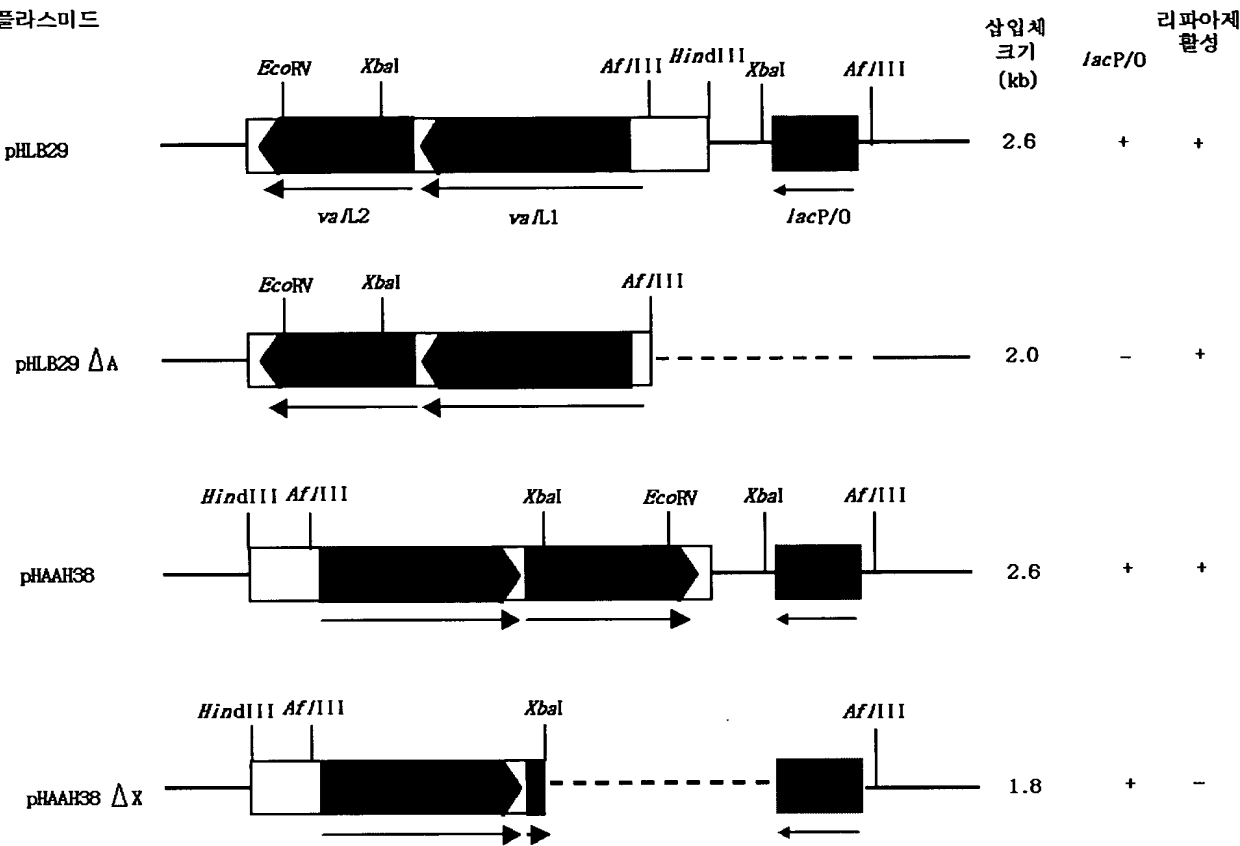
1	AGC	TTG	CAC	TTT	ATC	AGC	CAA	TAC	TTG	CAT	CGG	TAA
37	CTC	GGC	GGG	CAC	TTG	TGC	CCA	GTG	GCG	GCG	GCT	ACG
73	TAC	TTC	AGA	GAT	TAA	GGC	CAT	GAC	TAG	CGT	TTC	ATA
109	TAA	AAT	GGT	GTC	TCG	CCA	CGT	ACC	TTG	AAT	GGC	GAT
145	ACG	CAG	CTG	GCG	TTT	GCC	CTC	TTG	CTT	GAG	GAT	CCC
181	GAT	TTC	AAT	TTG	CCG	ATC	GGG	TTG	AAA	ATG	GAA	ATA
217	GCG	TAA	TGA	CTG	TAA	AAA	AGT	ACG	ATT	CAA	ATG	AGG
253	TGC	ATG	CTG	CTC	TAA	ATA	AAC	AAT	GTC	GGC	ATC	CGA
289	AAA	GCG	CAA	TGA	AGC	CAA	CTG	ATT	GAT	TTC	TTG	GCG
325	TAC	TTC	CTC	TAA	TAA	ATC	GCT	AAT	GTC	TTC	ATC	ACT
361	GCG	CAC	AAT	CAA	TTC	ATA	GCG	CAC	CTC	AAC	ATC	CGG
397	ATA	CAA	CGA	ATG	AAC	GGC	CTG	CAT	CAT	ATT	GAT	TTT
433	ATA	GGC	ATC	AAG	ATC	CAA	TAA	ACT	GCG	GAT	AAA	AAG
469	AGG	AGA	AAA	TAG	GCG	ATC	GCT	CAT	GAT	GAT	GCC	ATC
505	CTT	TCG	TTC	GGT	TTC	ATT	CAG	TCA	TTA	CGT	TAG	TAA
541	CAA	CGT	GTT	GCT	AAC	TTT	GGG	CGA	ACA	ATA	AAG	TAC
577	CCT	TGT	AAG	TTT	GTC	AAC	TTT	TGT	GAC	AAA	CCT	AGT
-35												
613	CAG	TCG	TTA	TTT	GGC	CTT	ATT	ATA	ATT	ATG	GAT	ATT
-10												
649	GAG	GGG	TAA	GGA	CGT	AGT	CAT	AAC	AAC	AAT	TAC	AGT
S D												
685	ACT	CTT	GTT	ATC	TGA	GTT	ATG	TTT	GTC	ACA	AAG	TCT
1												
721	TAT	TTA	CAT	TTG	ACC	ATC	ATC	ATG	CAC	TTA	CCT	AAA
7												
757	Y	L	H	L	T	I	I	M	H	L	P	K
19												
793	ATA	AGC	CCG	TTG	TTT	ATT	AGG	GAA	GCC	ATT	ATG	ATT
31												
829	I	S	P	L	F	I	R	E	A	I	M	I
793												
865	GTC	ACT	ATC	GAT	ATG	ATT	TGT	CTG	CGT	CTT	GCG	CCG
829												
897	V	T	I	D	M	I	C	L	R	L	A	P
43												
933	AAA	TCT	ATC	CAG	GTT	TTA	CTG	GTG	AAA	CGC	TCT	AAT
865												
969	K	S	I	Q	V	L	L	V	K	R	S	M
55												
1005	CCA	AAT	CCG	CCA	GAT	TGT	GGT	AAA	TGG	GCA	TTG	CCT
901												
1041	P	N	R	P	D	C	G	K	W	A	L	P
67												
1077	GGC	GGG	ATA	GTG	TAT	GAC	GAA	GAT	ATG	ACC	GCT	CAT
937												
1113	G	G	I	V	Y	D	E	D	M	T	A	H
79												
1149	GGT	GGA	GAA	CCT	GTC	GAT	GAG	GAT	TTT	GAT	GCA	GCG
973												
1185	G	G	E	P	V	D	E	D	F	D	A	A
91												
1221	AGA	CGA	CGT	ATT	TGT	CGG	CAA	AAA	GTC	CAT	ACT	TAT
1009												
1257	R	R	R	I	C	R	Q	K	V	H	T	Y
103												
1293	CCT	AAT	TTT	ATC	AGC	GAT	CCG	CTG	GTT	GAT	GGC	AAC
1045												
1329	P	N	F	I	S	D	P	L	V	D	G	N
115												
1365	CCC	AAA	CGC	GAT	CCG	AAT	GGT	TGG	AGT	GTC	AGT	ATT
1081												
1401	P	K	R	D	P	N	G	W	S	V	S	I
127												
1437	TCC	CAT	TAC	GCT	TTA	TTA	AAC	CCG	TGG	AAT	GTC	AAA
1117												
1473	S	H	Y	A	L	L	N	P	S	N	V	K
139												
1509	CAA	ATA	GAA	GAT	TTT	GGT	ATC	GAC	CCC	GAG	CGC	GCT
1153												
1545	Q	I	E	D	F	G	I	D	P	E	R	A
151												
1581	AAT	TGG	TTT	GAT	CTT	CAT	ACT	TTA	CTC	AAA	GAA	GAA
1189												
1617	N	W	F	D	L	H	T	L	L	K	E	E
163												
1653	ATG	CCG	CTG	GCT	TTT	GAT	CAT	GTC	GCG	CAA	ATT	CAG
1225												
1689	N	P	L	A	F	D	H	V	A	Q	I	Q
175												
1725	CAT	GCG	TGG	CAA	AAA	TTA	CGC	GCT	GCG	GTT	GAA	TAC
1261												
1761	H	A	W	Q	K	L	R	A	A	V	E	Y
187												
1797	ACA	TCC	GTG	GTA	CTA	TTT	TCA	TTA	GAA	AAA	GAG	TTT
1297												
1833	T	S	V	V	L	F	S	L	E	K	E	F
199												
1869	TTA	GTG	GCG	GAT	ATT	ATT	GAT	GCC	TAC	GCC	AAA	TTT
199												
1905	L	V	A	D	I	I	D	A	Y	A	K	F

【도 4b】

1333	GGC	GTC	GAA	GTT	AAT	CGC	ATG	ACC	ATT	AAA	CGC	CGC
211	G	V	E	V	N	R	M	T	I	K	R	R
1369	TTG	ATC	AAT	ACC	GGG	GTG	ATC	GTC	AGT	ACC	AAT	AAA
223	L	I	N	T	G	V	I	V	S	T	N	K
1405	ATG	GCC	GCA	TCT	TGT	AAA	GGC	AAA	GGA	GCC	AAA	CCA
235	M	A	A	S	C	K	G	K	G	G	K	P
1441	GCC	ACC	GTT	TAT	CGT	CTT	GCC	AGT	CAT	GAA	GTC	ACC
247	A	T	V	Y	R	L	A	S	H	E	V	T
1477	TAT	TTT	CAA	ACC	TGT	TTA	CGA	GGT	TAA	CTG	TTC	GAA
259	Y	F	Q	T	C	L	R	G				
1513	AAT	CGT	GTA	CAG	TAG	GTG	ATG	ATG	TCA	ATT	GAT	GAT
1549	AGG	TAG	GAA	GCA	ATG	CAG	ATT	ATT	CTT	GTT	CAT	GGA
1					M	Q	I	I	L	V	H	G
1585	CTC	TAT	ATG	CAT	GGC	TTG	GTA	ATG	CAT	CCG	CTT	AGT
9	L	Y	M	H	G	L	V	M	H	P	L	S
1621	CAT	CGT	CTG	CAT	AAA	TTG	GGT	TAT	CGT	ACT	CAA	ACC
21	H	R	L	H	K	L	G	Y	R	T	Q	T
1657	ATT	AGC	TAC	AAC	TCA	CTC	GCT	ATC	GAT	GAT	GAG	GCC
33	I	S	Y	N	S	L	A	I	D	D	E	A
1693	ATT	TTT	CGC	CGC	CTT	GAC	CGA	TCG	CTC	ACT	CAT	GCC
45	I	F	R	R	L	D	R	S	L	T	H	A
1729	TCG	CCT	AAT	GCT	TTA	GTC	GGA	CAC	AGT	TTG	GGC	GGA
57	S	P	N	A	L	V	G	H	S	L	G	G
1765	TTG	GTG	ATC	AAA	CGT	TAT	CTA	GAA	TCG	CGC	GCA	CCG
69	L	V	I	K	R	Y	L	E	S	R	A	P
1801	TCC	TGT	GAA	ACC	CTC	TCC	CAT	GTC	GTC	GCC	ATC	GGC
81	S	C	E	T	L	S	H	V	V	A	I	G
1837	TCA	CCT	TTG	CAA	GGA	GCT	TCC	ATT	GTC	AAT	AAA	ATT
93	S	P	L	Q	G	A	S	I	V	N	K	I
1873	GAG	CAA	TTA	GGT	TTA	GGG	GTG	GCA	CTA	GGT	AAT	TCA
105	E	Q	L	G	L	G	V	A	L	G	M	S
1909	GCA	GAA	TTT	GGG	TTA	AAA	GAA	CAC	GAC	GAC	GAA	TCC
141	A	E	F	G	L	K	E	H	D	D	E	W
1945	CGC	TAT	CCA	CAA	AAA	TCA	GGC	AGT	ATT	GCA	GGA	ACG
177	R	V	P	Q	K	L	G	S	I	A	G	T
1981	ATA	CCT	TTA	GGG	CTG	CGC	AGC	CTT	TTA	CTG	CGC	GAT
213	I	P	L	G	L	R	S	L	L	L	R	D
2017	CCA	CTG	GAC	TCC	GAT	GGT	ACC	GTC	ACA	GTA	GAA	GAA
225	Q	L	D	S	D	G	T	V	T	V	E	E
2053	ACC	AAA	ATA	GCT	GGC	ATG	ACA	GAT	CAT	ATC	GCG	ATA
237	T	K	I	A	G	M	T	D	H	I	A	I
2089	TCC	ACC	ACT	TCA	TAC	GAG	AAT	GCT	GTT	TAA	TCA	TTC
249	S	T	T	S	Y	E	N	A	V			
2125	CGT	TGC	CGA	GCA	AAT	CGA	CCA	CTT	TCT	TCG	TTA	TGA
2161	CCG	CTT	CCG	GCG	CTA	AAG	CCG	TTT	AAA	CTT	CAG	ATG
2197	ATA	GTG	TAC	TTC	GTA	TCA	AAC	CGA	TGG	TGA	TTG	AAA
2233	ACA	TAC	CCA	CCA	TTC	ATT	CAG	AAT	AAG	ACG	TTG	CCA
2269	TCA	TCA	GAG	CTT	TCC	CAT	GCA	ATA	AAC	AAT	CCG	CGA
2305	CTT	TAC	GTC	TGG	CCG	CTT	TAA	CTA	AAT	TGG	CAA	GTG
2341	TCT	GCC	GCG	ATA	CGC	TGA	TGC	CGC	ATA	GTT	AAG	CCA
2377	GCC	CCG	ACA	CCC	GCC	AAC	ACC	CGC	TGA	GCG	GCC	CTG
2413	ACG	GGC	TTG	TCT	GCT	CCC	GGC	ATC	CGC	TTA	CAG	ACA
2449	AGC	TGT	GAC	CGT	CTC	CGG	GAG	CTG	CAT	GTG	TCA	GAG
2485	GTT	TTC	ACC	GTC	ATC	ACC	GAA	ACG	CGC	GAG	ACG	AAA
2521	GGG	CCT	CGT	GAT	ACG	CCT	ATT	TTT	ATA	GGT	TAA	TGT
2557	CAT	GAT	AAT	AAT	GGT	TTC	TTA	G				

【도 5】

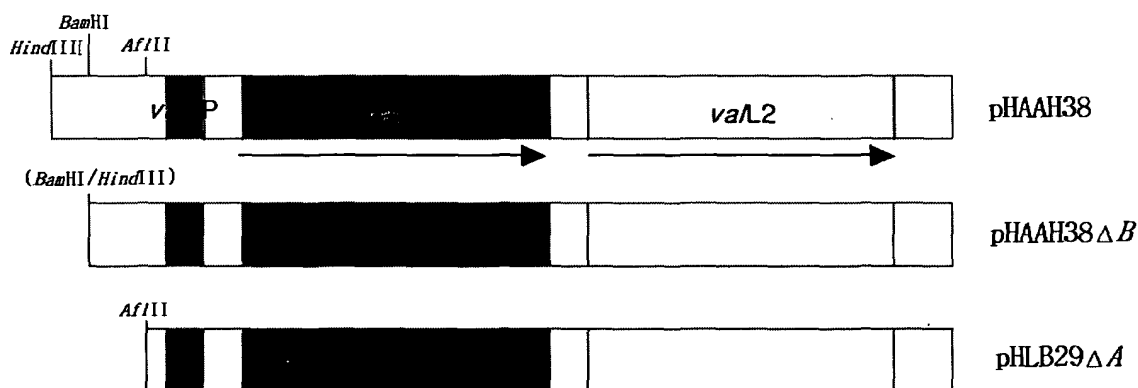
플라스미드



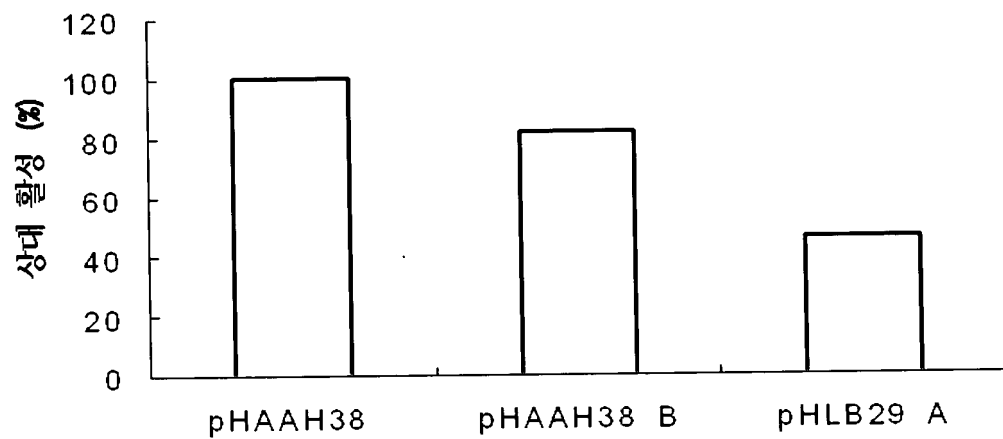
【도 6】

<i>Vibrio metschnikovii</i>	M Q I I L V H G L Y M H G L V M H P L S H R L H K L G Y R T	(1~30)
<i>Pseudomonas glumae</i>		V A N L S G F
<i>Burkholderia cepacia</i>		V A N L S G F
<i>Vibrio metschnikovii</i>	Q T I S Y N S L A I D D E A I F R R L D R S L T H A S P N A	(31~60)
<i>Pseudomonas glumae</i>	Q S D D G P N G R G E Q L L A Y V K Q V L A T T G A T K V N	
<i>Burkholderia cepacia</i>	Q S D D G P N G R G E Q L L A Y V K T V L A T T G A T K V N	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	L V G H S L G G L V I K R Y L E S R A F S C E T L S H V V A	(61~90)
<i>Pseudomonas glumae</i>	L I G H S Q G G L T - S R Y V A A V A P - - Q L V A S V T T	
<i>Burkholderia cepacia</i>	L V G H S Q G G L S - S R Y V A A V A P - - D L V A S V T T	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	I G S P L Q G A S I V N K I E Q L G L G V A L G N S A E F G	(91~120)
<i>Pseudomonas glumae</i>	I G T R H R G S E F A D F V Q D V L K T D P T G L S S T V I	
<i>Burkholderia cepacia</i>	I G T R H R G S E F A D F V Q D V L A Y D P T G L S S S V I	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	L K E H D D E W R Y P Q K L G S I A G T I P L G L R S L L L	(121~150)
<i>Pseudomonas glumae</i>	A A F V N V F G T L V S S S H N T D Q D A L A	
<i>Burkholderia cepacia</i>	A A F V N V F G I L T S S S H N T N Q D A L A	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	R D Q L D S D G T V T V E E T K I A G M T D H I A I S T T S	(151~180)
<i>Pseudomonas glumae</i>		
<i>Burkholderia cepacia</i>		
<i>Vibrio metschnikovii</i>	Y E N A V	(181~185)
<i>Pseudomonas glumae</i>		
<i>Burkholderia cepacia</i>		

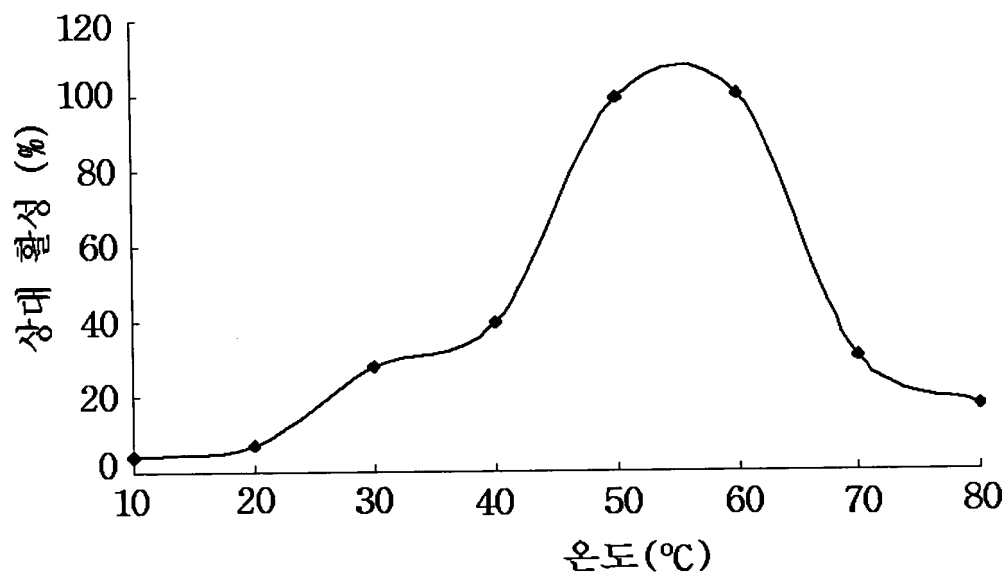
【도 7a】



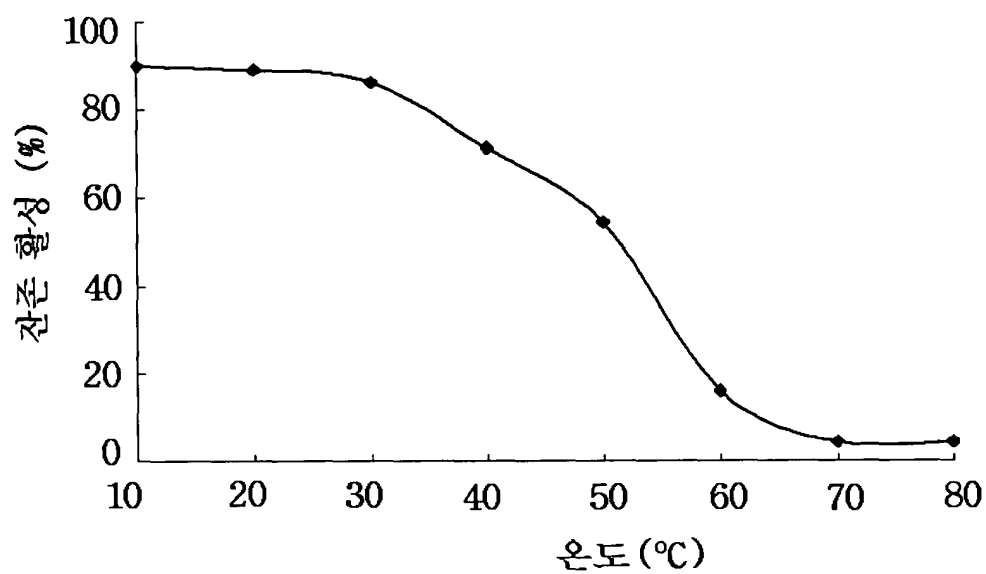
【도 7b】



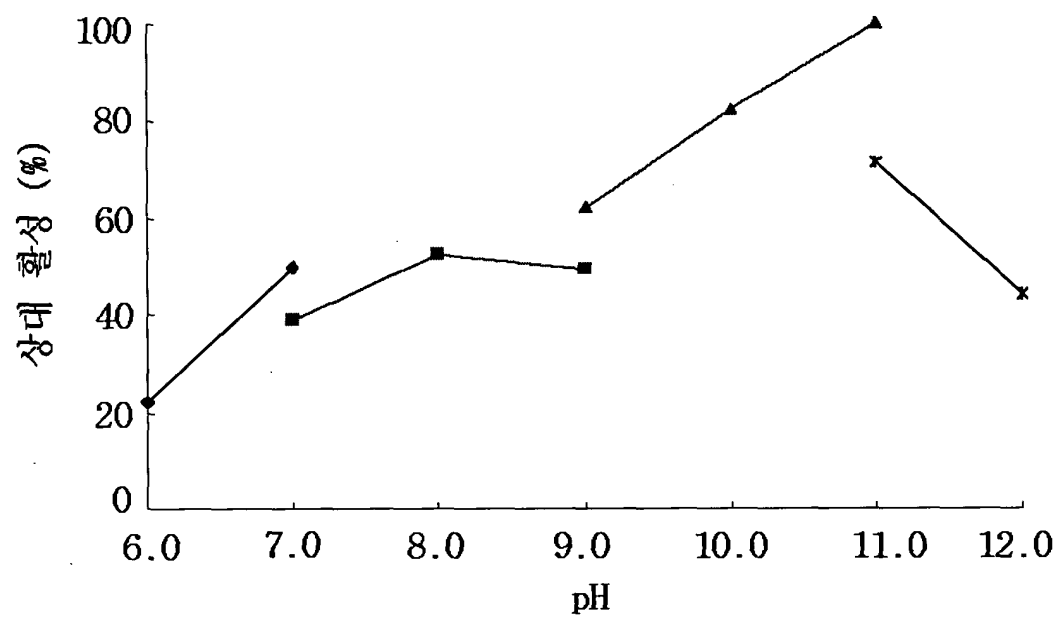
【도 8a】



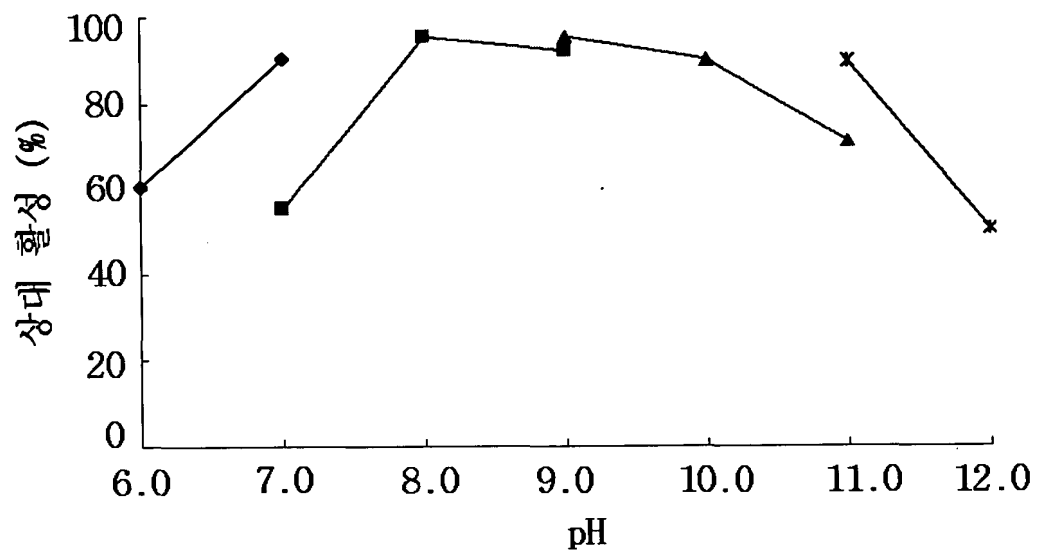
【도 8b】



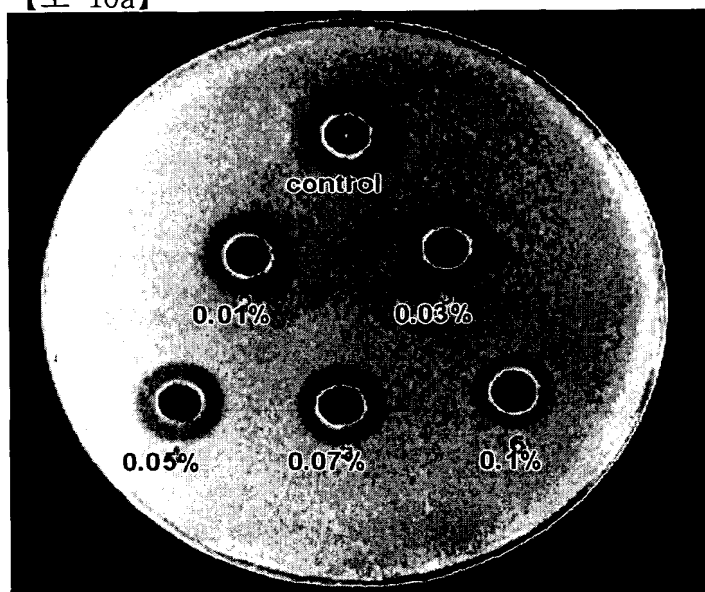
【도 9a】



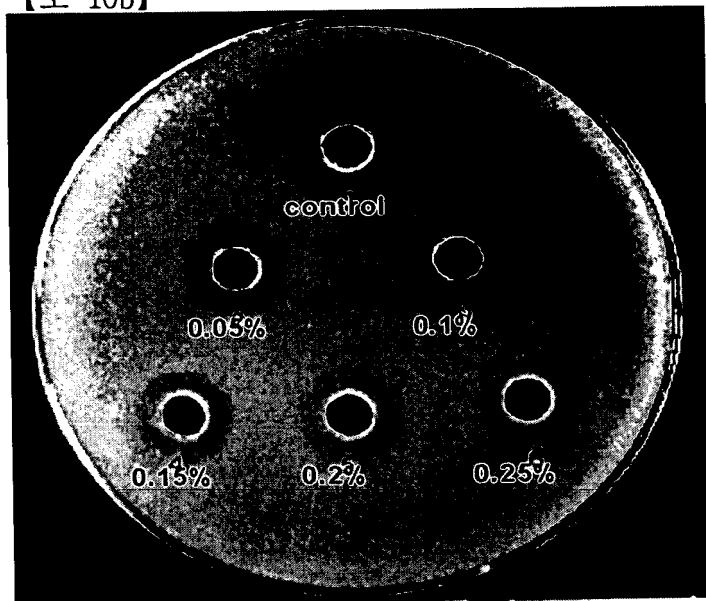
【도 9b】



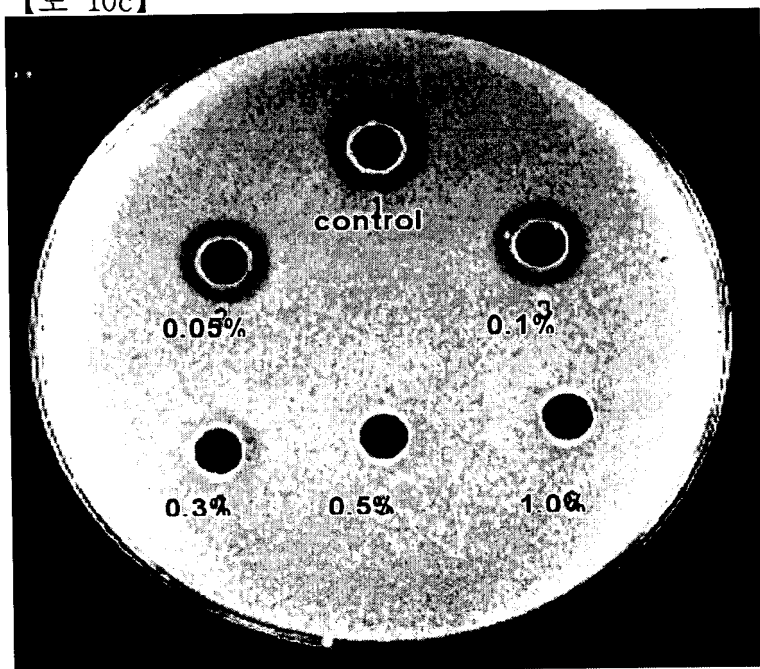
【도 10a】



【도 10b】



【도 10c】



【서열목록】

<110> Cheil Jedang Corporation <120> An alkaline lipase from *Vibrio*
metchnikovii RH530 and a nucleotide sequence encoding the same <160> 5
 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 2578 <212> DNA <213> *Vibrio*



1020020035410

출력 일자: 2003/6/14

metschnikovii RH530 <400>	1 agcttgcaact ttatcagcca atacttgcac cggtaactcg
gcgggcactt gtgcccagtg	60 gcggcggcta cgtacttcag agattaaggc catgactagc
gtttcatata aaatggtgtc	120 tcgccacgta ccttgaatgg cgatacgcag ctggcgtttg
ccctcttgct tgaggatccc	180 gatttcaatt tgccgatcgg gttgaaaatg gaaatagcgt
aatgactgta aaaaagtacg	240 attcaaata ggtgcatgct gctctaaata aacaatgtcg
gcatccgaaa agcgcaatga	300 agccaactga ttgatttctt ggcgtacttc ctctaataaa
tcgctaattgt cttcatcact	360 gcgcacaatc aattcatagc gcacctcaac atccggatac
aacgaatgaa cggcctgcat	420 catattgatt ttataggcat caagatccaa taaactgcgg
ataaaaagag gagaaaatag	480 gcgatcgctc atgatgatgc catcctttcg ttcggtttca
ttcagtcatt acgttagtaa	540 caacgtgttg ctaactttgg gcgaacaata aagtaccctt
gtaagtttgt caacttttgt	600 gacaaaccta gtcagtcgtt atttggcctt attataatta
tggatattga ggggtaagga	660 cgtagtcata acaacaatta cagtactctt gttatctgag
ttatgtttgt cacaaagtct	720 tatttacatt tgaccatcat catgcactta cctaaaataa
gcccgttggt tatttagggaa	780 gccattatga ttgtcactat cgatatgatt tgtctgcgtc
ttgcgccgaa atctatccag	840 gttttactgg tgaaacgctc taatccaaat cggccagatt
gtggtaaatg ggcattgcct	900 ggcgggatag tgtatgacga agatatgacc gctcatggtg
gagaacctgt cgatgaggat	960 tttgatgcag cgagacgacg tatttgtcgg caaaaagtcc
atacttatcc taattttatc	1020 agcgatccgc tggttgatgg caaccccaaa cgcgatccga
atggttggag tgtcagtatt	1080 tcccattacg ctttattaaa cccgtggaat gtcaaacaaa
tagaagattt tggatcgcac	1140 cccgagcgcg ctaattgggt tgatcttcat actttactca
aagaagaaat gccgctggct	1200 tttgatcatg tcgcgcaaat tcagcatgcg tggcaaaaat

tacgcgctgc ggttgaatac	1260 acatccgtgg tactattttc attagaaaaa gagtttttag
tggcggatat tattgatgcc	1320 tacgccaaat ttggcgtcga agttaatcgc atgaccatta
aacgccgctt gatcaatacc	1380 ggggtgatcg tcagtaacaa taaaatggcc gcatcttgta
aaggcaaagg agccaaacca	1440 gccaccgttt atcgtcttgc cagtcatgaa gtcacctatt
ttcaaacctg tttacgaggt	1500 taactgttcg aaaatcgtgt acagtaggtg atgatgtcaa
ttgatgatag gtaggaagca	1560 atgcagatta ttcttgttca tggactctat atgcatggct
tggtaatgca tccgcttagt	1620 catcgtctgc ataaattggg ttatcgtact caaaccatta
gctacaactc actcgctatc	1680 gatgatgagg ccatttttcg ccgccttgac cgatcgctca
ctcatgcctc gcctaatact	1740 ttagtcggac acagtttggg cggattgggtg atcaaactgt
atctagaatc gcgcgcaccg	1800 tcctgtgaaa ccctctccca tgtcgtcgcc atcggctcac
ctttgcaagg agcttccatt	1860 gtcaataaaa ttgagcaatt aggtttaggg gtggcactag
gtaattcagc agaatttggg	1920 ttaaaagaac acgacgacga atcccgtat ccacaaaaat
caggcagtat tgcaggaacg	1980 ataccttttag ggctgcgcag ccttttactg cgcgatccac
tggactccga tggtagcgtc	2040 acagtagaag aaacaaaaat agctggcatg acagatcata
tcgcgatatc caccacttca	2100 tacgagaatg ctgtttaatc attccgttgc cgagcaaate
gaccactttc ttcgttatga	2160 ccgcttccgg cgctaaagcc gtttaaactt cagatgatag
tgtacttcgt atcaaaccga	2220 tggtagattga aaacataccc accattcatt cagaataaga
cgttgccatc atcagagctt	2280 tcccatgcaa taaacaatcc gcgactttac gtctggccgc
tttaactaaa ttggcaagtg	2340 tctgccgcga tacgtgatg ccgcatagtt aagccagccc
cgacacccgc caacacccgc	2400 tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc ggcatccgct
tacagacaag ctgtgaccgt	2460 ctccgggagc tgcattgtgc agaggttttc accgtcatca



1020020035410

출력 일자: 2003/6/14

```
ccgaaacgcg cgagacgaaa      2520 gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg
ataataatgg tttcttag        2578 <210>    2 <211>    798 <212>    DNA <213>
Vibrio metschnikovii RH530 <220> <221>    CDS <222>    (1)..(798) <223>    valL1
gene <400>    2 atg ttt gtc aca aag tct tat tta cat ttg acc atc atc atg cac tta
48 Met Phe Val Thr Lys Ser Tyr Leu His Leu Thr Ile Ile Met His Leu    1
5              10              15              cct aaa ata agc ccg ttg ttt att agg
gaa gcc att atg att gtc act              96 Pro Lys Ile Ser Pro Leu Phe Ile Arg Glu Ala
Ile Met Ile Val Thr              20              25              30
atc gat atg att tgt etg cgt ctt gcg ccg aaa tct atc cag gtt tta              144 Ile Asp
Met Ile Cys Leu Arg Leu Ala Pro Lys Ser Ile Gln Val Leu              35
40              45              ctg gtg aaa cgc tct aat cca aat cgg cca gat tgt
ggg aaa tgg gca              192 Leu Val Lys Arg Ser Asn Pro Asn Arg Pro Asp Cys Gly Lys
Trp Ala              50              55              60              ttg cct
ggc ggg ata gtg tat gac gaa gat atg acc gct cat ggt gga              240 Leu Pro Gly Gly
Ile Val Tyr Asp Glu Asp Met Thr Ala His Gly Gly              65              70
75              80      gaa cct gtc gat gag gat ttt gat gca gcg aga cga cgt att tgt
cgg              288 Glu Pro Val Asp Glu Asp Phe Asp Ala Ala Arg Arg Arg Ile Cys Arg
85              90              95              caa aaa gtc cat act tat cct aat ttt
atc agc gat ccg ctg gtt gat              336 Gln Lys Val His Thr Tyr Pro Asn Phe Ile Ser
Asp Pro Leu Val Asp              100              105              110
ggc aac ccc aaa cgc gat ccg aat ggt tgg agt gtc agt att tcc cat              384 Gly Asn
```

Pro Lys Arg Asp Pro Asn Gly Trp Ser Val Ser Ile Ser His 115
 120 125 tac gct tta tta aac ccg tgg aat gtc aaa caa
 ata gaa gat ttt ggt 432 Tyr Ala Leu Leu Asn Pro Trp Asn Val Lys Gln Ile Glu
 Asp Phe Gly 130 135 140 atc
 gac ccc gag cgc gct aat tgg ttt gat ctt cat act tta ctc aaa 480 Ile Asp Pro
 Glu Arg Ala Asn Trp Phe Asp Leu His Thr Leu Leu Lys 145 150
 155 160 gaa gaa atg ccg ctg gct ttt gat cat gtc gcg caa att cag
 cat gcg 528 Glu Glu Met Pro Leu Ala Phe Asp His Val Ala Gln Ile Gln His Ala
 165 170 175 tgg caa aaa tta cgc gct gcg gtt
 gaa tac aca tcc gtg gta cta ttt 576 Trp Gln Lys Leu Arg Ala Ala Val Glu Tyr
 Thr Ser Val Val Leu Phe 180 185 190
 tca tta gaa aaa gag ttt tta gtg gcg gat att att gat gcc tac gcc 624 Ser Leu
 Glu Lys Glu Phe Leu Val Ala Asp Ile Ile Asp Ala Tyr Ala 195
 200 205 aaa ttt ggc gtc gaa gtt aat cgc atg acc att
 aaa cgc cgc ttg atc 672 Lys Phe Gly Val Glu Val Asn Arg Met Thr Ile Lys Arg
 Arg Leu Ile 210 215 220 aat
 acc ggg gtg atc gtc agt acc aat aaa atg gcc gca tct tgt aaa 720 Asn Thr Gly
 Val Ile Val Ser Thr Asn Lys Met Ala Ala Ser Cys Lys 225 230
 235 240 ggc aaa gga gcc aaa cca gcc acc gtt tat cgt ctt gcc agt
 cat gaa 768 Gly Lys Gly Ala Lys Pro Ala Thr Val Tyr Arg Leu Ala Ser His Glu
 245 250 255 gtc acc tat ttt caa acc tgt tta



1020020035410

출력 일자: 2003/6/14

cga ggt 798 Val Thr Tyr Phe Gln Thr Cys Leu Arg Gly
260 265 <210> 3 <211> 266 <212>
PRT <213> Vibrio metschnikovii RH530 <400> 3 Met Phe Val Thr Lys Ser Tyr Leu His
Leu Thr Ile Ile Met His Leu 1 5 10
15 Pro Lys Ile Ser Pro Leu Phe Ile Arg Glu Ala Ile Met Ile Val Thr 20
25 30 Ile Asp Met Ile Cys Leu Arg Leu Ala Pro Lys Ser Ile Gln Val
Leu 35 40 45 Leu Val Lys Arg Ser Asn Pro
Asn Arg Pro Asp Cys Gly Lys Trp Ala 50 55 60
Leu Pro Gly Gly Ile Val Tyr Asp Glu Asp Met Thr Ala His Gly Gly 65
70 75 80 Glu Pro Val Asp Glu Asp Phe Asp Ala Ala
Arg Arg Arg Ile Cys Arg 85 90 95
Gln Lys Val His Thr Tyr Pro Asn Phe Ile Ser Asp Pro Leu Val Asp 100
105 110 Gly Asn Pro Lys Arg Asp Pro Asn Gly Trp Ser Val Ser Ile Ser
His 115 120 125 Tyr Ala Leu Leu Asn Pro Trp
Asn Val Lys Gln Ile Glu Asp Phe Gly 130 135 140
Ile Asp Pro Glu Arg Ala Asn Trp Phe Asp Leu His Thr Leu Leu Lys 145
150 155 160 Glu Glu Met Pro Leu Ala Phe Asp His Val
Ala Gln Ile Gln His Ala 165 170 175
Trp Gln Lys Leu Arg Ala Ala Val Glu Tyr Thr Ser Val Val Leu Phe 180
185 190 Ser Leu Glu Lys Glu Phe Leu Val Ala Asp Ile Ile Asp Ala Tyr
Ala 195 200 205 Lys Phe Gly Val Glu Val Asn

Arg Met Thr Ile Lys Arg Arg Leu Ile 210 215 220
 Asn Thr Gly Val Ile Val Ser Thr Asn Lys Met Ala Ala Ser Cys Lys 225
 230 235 240 Gly Lys Gly Ala Lys Pro Ala Thr Val Tyr
 Arg Leu Ala Ser His Glu 245 250 255
 Val Thr Tyr Phe Gln Thr Cys Leu Arg Gly 260 265
 <210> 4 <211> 555 <212> DNA <213> Vibrio metschnikovii RH530 <220>
 <221> CDS <222> (1)..(555) <223> valL2 gene <400> 4 atg cag att att ctt
 gtt cat gga ctc tat atg cat ggc ttg gta atg 48 Met Gln Ile Ile Leu Val His
 Gly Leu Tyr Met His Gly Leu Val Met 1 5 10
 15 cat ccg ctt agt cat cgt ctg cat aaa ttg ggt tat cgt act caa acc
 96 His Pro Leu Ser His Arg Leu His Lys Leu Gly Tyr Arg Thr Gln Thr 20
 25 30 att agc tac aac tca ctc gct atc gat gat gag gcc att
 ttt cgc cgc 144 Ile Ser Tyr Asn Ser Leu Ala Ile Asp Asp Glu Ala Ile Phe Arg
 Arg 35 40 45 ctt gac cga
 tcg ctc act cat gcc tcg cct aat gct tta gtc gga cac 192 Leu Asp Arg Ser Leu
 Thr His Ala Ser Pro Asn Ala Leu Val Gly His 50 55
 60 agt ttg ggc gga ttg gtg atc aaa cgt tat cta gaa tcg cgc gca ccg
 240 Ser Leu Gly Gly Leu Val Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Ser Arg Ala Pro 65
 70 75 80 tcc tgt gaa acc ctc tcc cat gtc gtc gcc
 atc ggc tca cct ttg caa 288 Ser Cys Glu Thr Leu Ser His Val Val Ala Ile Gly
 Ser Pro Leu Gln 85 90 95

gga gct tcc att gtc aat aaa att gag caa tta ggt tta ggg gtg gca 336 Gly Ala
 Ser Ile Val Asn Lys Ile Glu Gln Leu Gly Leu Gly Val Ala 100
 105 110 cta ggt aat tca gca gaa ttt ggg tta aaa gaa cac
 gac gac gaa tcc 384 Leu Gly Asn Ser Ala Glu Phe Gly Leu Lys Glu His Asp Asp
 Glu Ser 115 120 125 cgc tat
 cca caa aaa tca ggc agt att gca gga acg ata cct tta ggg 432 Arg Tyr Pro Gln
 Lys Ser Gly Ser Ile Ala Gly Thr Ile Pro Leu Gly 130 135
 140 ctg cgc agc ctt tta ctg cgc gat cca ctg gac tcc gat ggt acc
 gtc 480 Leu Arg Ser Leu Leu Leu Arg Asp Pro Leu Asp Ser Asp Gly Thr Val
 145 150 155 160 aca gta gaa gaa
 acc aaa ata gct ggc atg aca gat cat atc gcg ata 528 Thr Val Glu Glu Thr Lys
 Ile Ala Gly Met Thr Asp His Ile Ala Ile 165 170
 175 tcc acc act tca tac gag aat gct gtt
 555 Ser Thr Thr Ser Tyr Glu Asn Ala Val
 180 185 <210> 5 <211> 185 <212>
 PRT <213> *Vibrio metschnikovii* RH530 <400> 5 Met Gln Ile Ile Leu Val His Gly Leu
 Tyr Met His Gly Leu Val Met 1 5 10
 15 His Pro Leu Ser His Arg Leu His Lys Leu Gly Tyr Arg Thr Gln Thr 20
 25 30 Ile Ser Tyr Asn Ser Leu Ala Ile Asp Asp Glu Ala Ile Phe Arg
 Arg 35 40 45 Leu Asp Arg Ser Leu Thr His
 Ala Ser Pro Asn Ala Leu Val Gly His 50 55 60

Ser Leu Gly Gly Leu Val Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Ser Arg Ala Pro 65
70 75 80 Ser Cys Glu Thr Leu Ser His Val Val Ala
Ile Gly Ser Pro Leu Gln 85 90 95
Gly Ala Ser Ile Val Asn Lys Ile Glu Gln Leu Gly Leu Gly Val Ala 100
105 110 Leu Gly Asn Ser Ala Glu Phe Gly Leu Lys Glu His Asp Asp Glu
Ser 115 120 125 Arg Tyr Pro Gln Lys Ser Gly
Ser Ile Ala Gly Thr Ile Pro Leu Gly 130 135 140
Leu Arg Ser Leu Leu Leu Arg Asp Pro Leu Asp Ser Asp Gly Thr Val 145
150 155 160 Thr Val Glu Glu Thr Lys Ile Ala Gly Met
Thr Asp His Ile Ala Ile 165 170 175
Ser Thr Thr Ser Tyr Glu Asn Ala Val 180 185